

Verhalten dieser Verbindungen bleibt bei den meisten Systemen zur Trennung von Jodphenolen unbeachtet, weil die Ansicht besteht, daß diese Substanzen mit chemischen Farbreagenzien keine Reaktion eingehen. Da sie mit Jodreagenzien aber doch darstellbar sind, und da sie ein ähnliches chromatographisches Verhalten haben wie einige ihrer Jodderivate, kann das zu Fehlinterpretationen führen.

Die Farbreaktion beider nicht jodierter phenolischer Aminosäuren mit der Ferri-Ferricyanid-arsenige Säure-

Lösung ist nicht katalytisch. Die Pigmentbildung erfolgt auf Grund der reduzierenden Eigenschaften der phenolischen Gruppe dieser Substanzen und bei Thyronin vor allem durch die Anwesenheit des Äther-Sauerstoffs (29). Da der Mechanismus der Gmelin-Virtanen-Reaktion ähnlich dem der Kolthoff-Sandell-Reaktion ist (30), kann man vermuten, daß Thyronin und Tyrosin mit letzterem ebenfalls falsch positiv reagieren.

### Literatur

1. ZAPPI, E., Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, (1967). — 2. HOPPE, G., E. ZAPPI und G. GRIES, Nucl.-Med. (Stuttgart) 6, 44 (1967). — 3. ZAPPI, E., J. Chromatog. 30, 611 (1967). — 4. ZAPPI, E. und G. HOPPE, Nucl.-Med. (Stuttgart) 6, 420 (1967). — 5. ZAPPI, E. und G. HOPPE, diese Z. 6, 105 (1968). — 6. ZAPPI, E. und G. HOPPE, diese Z. 5, 209 (1967). — 7. BEALE, D. und J. K. WHITEHEAD, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 5, 150 (1960). — 8. WELBY M. L. und B. S. HETZEL, Nature (London) 193, 752 (1962). — 9. DIMITRIADOU, A., R. FRASER und P. C. R. TURNER, Nature (London) 201, 575 (1964). — 10. SHALOM, E. S., J. Endocr. 36, 1 (1966). — 11. COENEGRACHT, J. und TH. POSTMES, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 16, 432 (1967). — 12. FÖLDES J., G. GYERTYÁNFY, G. TAMÁS, E. GESZTESI und I. TAKÁCS, Nucl.-Med. (Stuttgart) 6, 400 (1967). — 13. WEINERT, H., H. MASUI, I. RADICHEVICH und S. C. WERNER, J. Clin. Invest. 46, 1264 (1967). — 14. RHODES, B. A. und H. N. WAGNER jun., Nature (London) 210, 647 (1966). — 15. ANDRADA, J. A. und E. ZAPPI, z. veröff. — 16. BOWDEN, C. H., N. F. MACLAGAN und J. H. WILKINSON,

- Biochem. J. 59, 93 (1955). — 17. KONO, T., L. VAN MIDDLESWORTH und E. B. ASTWOOD, Endocrinology 66, 844 (1960). — 18. BJÖRKSTEN, F., R. GRÄSBECK und B. A. LAMBERG, Acta chem. Scand. 15, 1165 (1961). — 19. BARKER, S. B., Biochem. J. 90, 214 (1964). — 20. ROW, V. V., R. VOLPE und C. EZRIN, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 13, 666 (1966). — 21. GMELIN R. und A. I. VIRTANEN, Acta chem. Scand. 13, 1469 (1959). — 22. ZAPPI, E., J. Chromatog. 31, 241 (1967). — 23. Klein, E., Die Krankheiten der Schilddrüse, S. 73. Hrsg. von K. Oberdisse und E. Klein. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1967). — 24. SCHMIDT M. und E. ZAPPI, z. veröff. — 25. PRANGE, F. und E. ZAPPI, z. veröff. — 26. BLOCK, R. J., S. C. WERNER, R. H. MANDL, V. V. ROW und I. RADICHEVICH, Arch. Biochem. Biophysics 88, 98 (1960). — 27. WIENER, J. D., Acta endocr., K'hvn, 48, 199 (1965). — 28. EMRICH, D., in Radioisotope in der Endokrinologie, S. 145, Hrsg. von H. Hoffmann, F. K. Schattauer-Verlag, Stuttgart (1965). — 29. ZAPPI, E., z. veröff. — 30. POSTMES TH., Acta endocr., K'hvn, 42, 153 (1963).

Dr. E. Zappi

Gegenwärtige Anschrift: New York Medical College,  
Dep. of Microbiology & Immunology 5th Av. at 106  
Street, New York 29, New York, USA

## Über die photometrische Titration von Thiazolidinen mit *p*-Mercuribenzoat<sup>1)</sup> und die Anwendung zur enzymatisch-photometrischen Penicillinbestimmung

Von F. KÖRBER, DAGMAR MODERSOHN und P. SIEGMUND

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 4. April 1968)

Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

1. Thiazolidine reagieren rasch mit *p*-Mercuribenzoat, wobei die Extinktion bei 250 nm zunimmt. Diese Reaktion kann zur photometrischen Titration der Thiazolidine benutzt werden.
2. Benzylpenicillin reagiert trotz seines Thiazolidinringes nur außerordentlich langsam mit *p*-Mercuribenzoat. Nach Spaltung mit Penicillinase erfolgt aber eine rasche und quantitative Reaktion mit *p*-Mercuribenzoat. Diese Reaktionsfolge kann zu einer spezifischen Penicillinbestimmung benutzt werden.
3. Bei Zugabe von Mercaptalen — es wurde Djenkolsäure und zwei ihrer Derivate untersucht — zu *p*-Mercuribenzoat tritt keine oder nur eine sehr langsame Erhöhung der Extinktion bei 250 nm ein.
4. Für die Herstellung der Thiazolidine aus L-Glycerinaldehyd und L-Cystein bzw. D-Penicillamin wird eine vereinfachte Vorschrift angegeben.

1. Thiazolidines react rapidly with *p*-mercuribenzoate with an increase in optical density at 250 nm. This reaction can be used for the photometric titration of thiazolidines.
2. Benzylpenicillin, despite its thiazolidine ring, reacts extremely slowly with *p*-mercuribenzoate. After cleavage with penicillinase, however, there is a rapid and quantitative reaction with *p*-mercuribenzoate. This sequence of reactions can be used for the specific determination of penicillin.
3. The addition of mercaptals (djenkolic acid and two of its derivatives were tried) to *p*-mercuribenzoate gives no or a very slow increase in extinction at 250 nm.
4. A simplified procedure is reported for the preparation of thiazolidines from the reaction of L-glyceraldehyde with L-cysteine or D-penicillamine.

<sup>1)</sup> In der aus *p*-Chlormercuribenzoat und Acetatpuffer bereiteten Reagenzlösung richtet sich der Grad der Assoziation des Quecksilbers im Mercuribenzoat mit Anionen nach den Konzentrations-

verhältnissen. Unter der Bezeichnung *p*-Mercuribenzoat werden sämtliche Assoziationsprodukte verstanden. (2).

Wir haben kürzlich über die Spaltung und Bestimmung (1) eines Thiazolidins [2-Methyl-2,4-dicarboxy-thiazolidinyl-(3)-essigsäure] mit dem von BOYER (2) zur photometrischen SH-Gruppenbestimmung eingeführten *p*-Mercuribenzoat berichtet und dabei gezeigt, daß das Reagenz nicht nur mit im Gleichgewicht vorhandenen freien SH-Gruppen, sondern auch direkt mit dem Thiazolidinring unter Mercaptidbildung und Zunahme der Extinktion bei 250 nm reagiert. Diese Reaktion ist nicht die einzige Ausnahme von der Spezifität des Reagenzes auf SH-Gruppen (2–4).

Wir haben nun geprüft, ob auch andere Thiazolidine und Penicillin mit *p*-Mercuribenzoat bestimmt werden können. Als Beispiele einfacher Thiazolidine wählten wir die Reaktionsprodukte von Cystein oder Penicillamin mit Formaldehyd, L-Glycerinaldehyd, Brenztraubensäure und Glucose; die Thiazolidinstruktur dieser Substanzen ist gesichert bzw. sehr wahrscheinlich (5–8). Weiter wurde Benzylpenicillosäure untersucht.

Zum Vergleich haben wir geprüft, ob Mercaptale von Aldehyden und Ketonen ebenfalls reagieren. Als Beispiele für Mercaptale benutzten wir Djenkolsäure, Phenyljdjenkolsäure und Dimethyldjenkolsäure.

Die Untersuchung der Reaktion erfolgte so, daß in einer Quarzküvette 0,25 ml der etwa 0,5 mm Substanzlösung zu 10 ml der etwa 25  $\mu$ M *p*-Mercuribenzoat-Lösung in Acetatpuffer (pH 4,6) gegeben und die Extinktion bei 250 nm in Abständen von einigen Minuten gemessen wurde. Wenn sich ein konstanter Wert eingestellt hatte, wurde das nicht umgesetzte *p*-Mercuribenzoat vor dem Photometer mit 0,5 mm Cysteinlösung zurücktitriert. Der Äquivalenzpunkt dieser Rücktitration wurde graphisch ermittelt (Abb. 1).

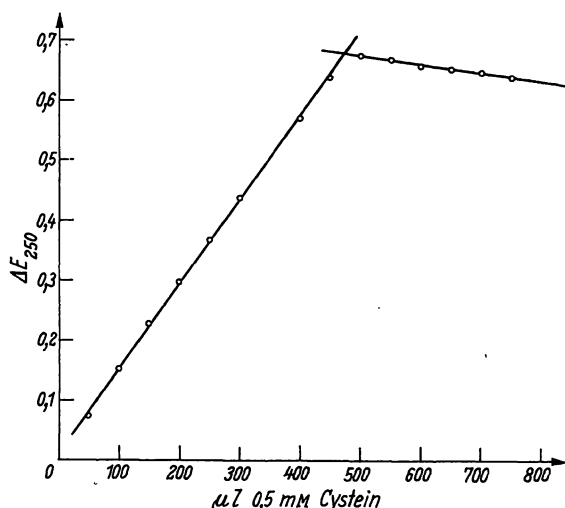


Abb. 1

Graphische Ermittlung des Äquivalenzpunktes bei der Titration von *p*-Mercuribenzoat mit Cysteinlösung

## Ergebnisse

Mit dem Thiazolidin aus Cystein und Glucose (Cystein-Glucose) verläuft die Reaktion sehr schnell: Nach der starken Extinktionserhöhung unmittelbar nach dem Zusammengeben der Komponenten trat in den nächsten

Minuten wieder eine gewisse Abnahme ein. Innerhalb weniger Minuten war ein konstanter Extinktionswert erreicht. Da Cystein-Glucose (in der angewandten Konzentration) bei 250 nm nicht absorbiert, muß dieser anomale Verlauf der Extinktion so gedeutet werden, daß der Mercaptidbildung die Entstehung eines stärker absorbierenden Addukts der Reaktionspartner vorausgeht (Abb. 2).

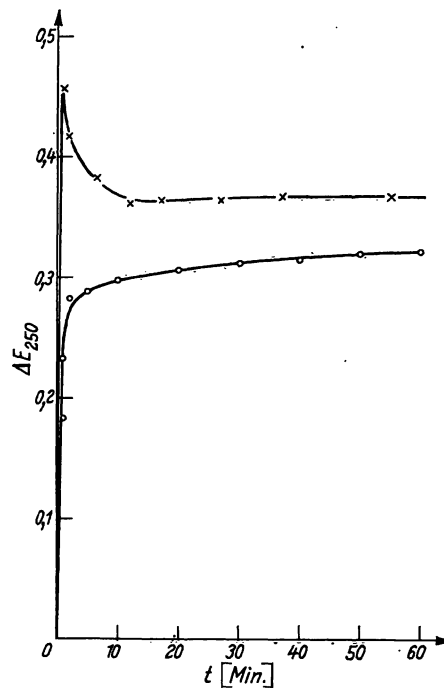


Abb. 2

Extinktionsänderung bei 250 nm von *p*-Mercuribenzoatlösungen nach Zugabe der Thiazolidine aus Cystein und Glucose x—x bzw. aus Cystein und Glycerinaldehyd o—o

Thiazolidin-4-carbonsäure und die aus L-Glycerinaldehyd und Cystein bzw. Penicillamin hergestellten Thiazolidine reagieren ebenfalls sehr schnell, die Extinktionen nehmen rasch zu und haben nach 10 bis höchstens 30 Min. einen konstanten Wert erreicht (Abb. 2). Entsprechendes gilt für das Thiazolidin aus Pyruvat und Cystein (2-Methyl-thiazolidin-2,4-dicarbonsäure). Gelegentlich wird nach der Hauptreaktion noch eine sich über etwa 1 Std. erstreckende geringfügige (schleichende) Extinktionszunahme beobachtet. Aus der nachfolgenden Rücktitration mit Cystein ergab sich, daß der *p*-Mercuribenzoatverbrauch zwischen 95 und 100% der äquivalenten Menge betrug (Tab. 1).

Der Thiazolidinring im Penicillin reagiert dagegen mit *p*-Mercuribenzoat außerordentlich langsam: eine Stunde nach dem Zusammengeben der Komponenten hatte die Extinktion bei 250 nm nur geringfügig zugenommen und auch die Rücktitration nach 18 Stdn. ergab nur einen *p*-Mercuribenzoat-Verbrauch von 30% der äquivalenten Menge. Wenn der Lactamring aber zuvor mit Natronlauge, oder besser durch Penicillinase<sup>2)</sup>, gespalten worden war, ist die Reaktionsgeschwindigkeit so groß wie bei den einfachen Thiazolidinen und im Fall der vorangehenden enzymatischen

<sup>2)</sup> Penicillin Amidohydrolase (EC 3.5.2.6)

Tab. 1  
Gehalts-Bestimmung von Thiazolidinen mit *p*-Mercuribenzoat

	100,0%
	98,3%
	98,3%
	94,1%
	98,3%
	98,7%

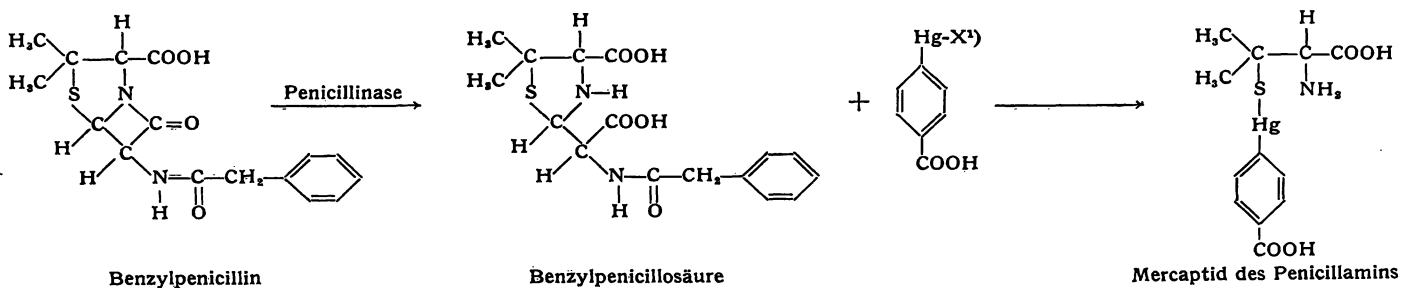
Spaltung wird die äquivalente Mercuribenzoatmenge verbraucht. Die so ermittelten Werte für den Penicillin-gehalt verschiedener Präparate stimmen mit der jodo-metrischen Bestimmung nach dem 3. Nachtrag zum DAB 6 (9) innerhalb von 1% überein (vgl. Tab. 2). Auch reine Benzylpenicillosäure (Reaktionsprodukt der enzymatischen Penicillinhydrolyse) verbraucht die äqui-valente Menge Mercuribenzoat. Danach ist für diese Penicillinbestimmung ein Reaktionsverlauf gemäß dem angegebenen Schema anzunehmen. (Wird Penicillin

Tab. 2  
Gehalts-Bestimmungen von Benzyl-Penicillinpräparaten verschiedener Herkunft

Methode	Kaliumsalz (Bayer)	(Hoechst)	Natriumsalz (Heyl)	(Hoechst) für Testzwecke 1650 E/mg	
Jodometrie nach (18)	100,9	95,8	94,8	96,9	%
optische Drehung	98,8	94,5	93,1	95,4	%
Titration mit <i>p</i> -Mercuri- benzoat nach					
a) enzymat. Spaltung	100,3	95,8	96,1	96,8	%
b) alkal. Spaltung	91,0	88,4	88,0	90,7	%

Penicillinase) ausgeschlossen werden, bzw. als Korrek-turwert berücksichtigt werden. Die Methode hat dann die gleiche Spezifität wie das Enzym Penicillinase. Die für die Bestimmung erforderlichen Penicillinmengen sind sehr gering: für eine Titration wird nur etwa 0,1  $\mu$ Mol Penicillin (bzw. sein Hydrolysenprodukt) eingesetzt.

Von den Mercaptalen reagierte Djenkolsäure über-haupt nicht mit *p*-Mercuribenzoat; auch nach Stunden wurde das eingesetzte Reagenz quantitativ wiederge-funden. Bei Phenyl- und Dimethyldjenkolsäure erfolgte nach der Zugabe zum Reagenz zwar eine langsame Zunahme der Extinktion (Abb. 3), aber selbst nach 18 Std. war der Umsatz nicht vollständig, denn auch dann ergaben die Rücktitrationen mit Cystein nur einen *p*-Mercuribenzoatverbrauch zwischen 70 und 90% der äquivalenten Mengen. Die Reaktion ist daher nicht zur Bestimmung dieser Mercaptale geeignet. Es ist aber zu beachten, daß anwesende Mercaptale bei anderen Bestimmungen mit *p*-Mercuribenzoat die Resultate verfälschen können.



Reaktionsfolge bei der enzymatisch-photometrischen Penicillinbestimmung

durch alkalische Hydrolyse gespalten, ist der Mercuribenzoatverbrauch jedoch erheblich geringer.)

Die Kombination der enzymatischen Penicillinhydrolyse mit nachfolgender Bestimmung der Penicillosäure mit Mercuribenzoat hat gegenüber der nur als Konventionsmethode geltenden jodometrischen Bestimmung nach (9) die Vorteile des eindeutigen Reaktionsverlaufs und der Spezifität. Die Anwesenheit anderer mit Mercuribenzoat unter Mercaptidbildung reagierender Substanzen (z. B. Spaltprodukte des Penicillins) kann durch eine Parallelbestimmung (ohne

## Material und Methoden

Extinktionsmessungen erfolgten mit dem Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss. Drehwinkel wurden mit dem lichtelektrischen Polarimeter 0,005 der gleichen Firma gemessen und  $\alpha_D$  interpoliert.

Penicilline erhielten wir von den Farbwerken Hoechst AG, den Farbenfabriken Bayer AG und Heyl & Co. D-Penicillamin von Heyl & Co.

Penicillinase war ein Präparat der Riker Laboratories, Northridge, California (Neutrapen, Penicillinase injectable). Die Ampulle enthält 1 Million Einheiten gereinigte Penicillinase (die Einheit ist hier als die Menge definiert, die bei 25° und pH 7 eine Einheit Penicillin in einer Min. inaktiviert). Die übrigen Präparate

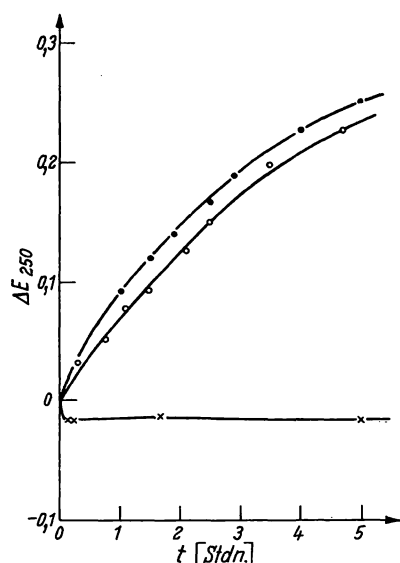


Abb. 3

Extinktionsänderung bei 250 nm von *p*-Mercuribenzoatlösungen nach Zusatz von Djenkolsäure  $\times$ — $\times$   
Phenylidjenkolsäure  $\circ$ — $\circ$   
Dimethylidjenkolsäure  $\bullet$ — $\bullet$

waren, sofern im folgenden über ihre Herstellung keine besonderen Angaben gemacht werden, analysenreine Handelspräparate. Die Reinheitskontrolle der von uns hergestellten Substanzen erfolgte bei hinreichender Löslichkeit und Beständigkeit durch acidimetrische Titration von 250  $\mu$ Val mit 0,5N Natronlauge (Mikrodosimeter, 1  $\mu$ l ablesbar) an der Glaselektrode (Elektrode: Ingold, Type 405, Knick-pH-Meter, Type 35).

*Thiazolidin-4-carbonsäure* wurde nach Ratner (8) aus Cystein und Formaldehyd in mit Pyridin gepufferter wäbr. Lösung hergestellt und mit Äthanol gefällt.

*2-Methyl-2,4-dicarboxy-thiazolidin* wurde nach Schubert (6) aus frisch destillierter Brenztraubensäure und Cystein erhalten und aus absol. Äthanol umkristallisiert.

*2-(1,2,3,4,5-pentahydroxypentyl)-4-carboxy-thiazolidin* (Cystein-Glucose) wurde nach Weitzel (7) durch Kondensation von Glucose mit Cystein in Gegenwart von Pyridin in methanol. Lösung hergestellt und aus Methanol umkristallisiert.

*2-(1,2-Dihydroxyäthyl)-4-carboxy-thiazolidin* (Cystein-Glycerinaldehyd) und *2-(1,2-Dihydroxyäthyl)-4-carboxy-5,5-dimethylthiazolidin* (Penicillamin-Glycerinaldehyd) wurden durch Kondensation von L-Glycerinaldehyd mit dem entsprechenden 1,2-Aminothiol wie folgt erhalten<sup>3)</sup>: Durch Oxydation von L-Sorbose mit Bleitetraacetat in Eisessig wurde ein L-Glycerinaldehydester nach PERLIN (10) hergestellt, im 12,5fachen Volumen 0,05N HCl aufgenommen und 8 Stdn. bei 50° hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde filtriert, der Gehalt an Glycerinaldehyd jodometrisch ermittelt und die Salzsäure mit dem 7fachen Überschuß Pyridin abgepuffert. In diese Lösung wurden L-Cystein- oder D-Penicillamin-Hydrochlorid in den zum L-Glycerinaldehyd äquivalenten Mengen gegeben. Nach 18 Stdn. (Raumtemperatur) wurde im Vakuum (Rotationsverdampfer) eingengt. Der dabei erhaltene gelbe Sirup wurde in absol. Äthanol aufgenommen. Der Ansatz mit L-Cystein kristallisierte sofort, der mit D-Penicillamin im Verlauf von 12 Stdn. im Kühlschrank. Die Substanzen wurden abgesaugt, mit absol. Äthanol gewaschen, im Vakuum über  $P_2O_5$  getrocknet und aus Methanol umkristallisiert. Die Identität der Substanzen wurde durch acidimetrische Titration und bei dem Penicillaminderivat auch durch eine Elementaranalyse gesichert:

*2-(1,2-Dihydroxyäthyl)-4-carboxy-thiazolidin*

$C_6H_{11}O_4NS$  (193,22) durch acidimetrische Titration (s. o.) gefunden: 192,98

<sup>3)</sup> Eine andere Vorschrift für die Herstellung wird in (5) angegeben.

*2-(1,2-Dihydroxyäthyl)-4-carboxy-5,5-dimethyl-thiazolidin*

$C_8H_{15}O_4NS$  (221,28) durch acidimetrische Titration (s. o.) gefunden: 220,49

Ber. C 43,42 H 6,83 N 6,33%

Gef. C 42,92 H 6,80 N 6,09%

42,71 6,81 6,07%

Die C,H-Bestimmung wurde im analytischen Laboratorium der Schering AG, Berlin, durchgeführt.

*Benzylpenicillosäure* [4-Carboxy-5,5-dimethyl-thiazolidinyl-(2)- $\alpha$ -phenylacetamidoessigsäure] wurde nach der wie folgt modifizierten Vorschrift von MERZ (11) erhalten: 10 g Penicillin wurden in wenig Wasser suspendiert und unter Kühlung auf 0° allmählich mit 30 ml 1N KOH versetzt. Dabei entstand eine klare Lösung, die 30 Min. bei 0° und anschließend 4 Stdn. bei Raumtemperatur belassen wurde. Nach Überschichten mit 100 ml Essigsäureäthylester wurde mit 25 ml 20proz. Phosphorsäure allmählich angesäuert und der ausfallende Niederschlag durch Schütteln in der Esterphase gelöst. Diese wurde mit  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Filtrat bis zur beginnenden Abscheidung im Vakuum eingengt. Der Rückstand (etwa 60 ml) wurde tropfenweise unter kräftigem Rühren zu 200 ml trockenem Äther gegeben. Die ausfallende Benzylpenicillosäure wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

*Djenkolsäure-Hydrochlorid* [Bis-(2-amino-2-carboxyäthylmercapto)-methan] und *Phenylidjenkolsäure* [Bis-(2-amino-2-carboxyäthylmercapto)-phenylmethan] wurden nach ARMSTRONG (12, 13) durch Kondensation von Formaldehyd bzw. Benzaldehyd mit Cystein hergestellt.

*Dimethylidjenkolsäure* [2,2-Bis-(2-amino-2-carboxy-äthylmercapto)-propan] wurde nach (13) als Hydrochlorid aus Aceton und Cystein in 6N HCl erhalten.

#### Photometrische Titration

10 ml 25  $\mu$ M *p*-Mercuribenzoatlösung, die sich in einer 4 cm Quarzküvette befinden, werden unter Verfolgung der Extinktion bei 250 nm gegen eine Vergleichsküvette, die mit der gleichen Lösung gefüllt ist, in 50  $\mu$ l-Schritten (Konstriktionspipette) mit 0,5 mm Cysteinlösung titriert. Wenn bei fünf aufeinanderfolgenden Zugaben die Extinktion konstant bleibt oder nur ein geringer Abfall (Verdünnung) beobachtet wird, ist die Titration beendet. Der Äquivalenzpunkt wird dann graphisch ermittelt (Abb. 1). Mit den etwa 0,5 mm Lösungen der zu bestimmenden Substanz wurde bei hinreichend schneller Reaktion mit Mercuribenzoat entsprechend verfahren. Meistens wurde jedoch eine Rücktitration durchgeführt. Hierzu wurden 0,25 ml der etwa 0,5 mm Substanzlösungen zu der 25  $\mu$ M *p*-Mercuribenzoatlösung gegeben und nach Erreichen einer konstanten Extinktion bzw. nach den angegebenen Zeiten das nicht umgesetzte *p*-Mercuribenzoat mit 0,5 mm Cystein-Lösung zurücktitriert.

Die Reagenzlösung wird folgendermaßen hergestellt (2):

*p*-Chlormercuribenzoat wird in 1 mm NaOH zu einer 1 mm Stammlösung gelöst und durch Zentrifugation geklärt, 5 ml dieser Stammlösung werden mit 0,33 M Acetatpuffer (pH 4,6) auf 200 ml aufgefüllt. Die genaue Konzentration dieser Verdünnung wurde dann am Versuchstag mit einer frisch bereiteten 0,5 mm Cystein-Hydrochlorid-Lösung wie oben bestimmt.

#### Enzymatische Hydrolyse von Benzylpenicillin (14)

Etwa 50  $\mu$ Mol genau gewogenes Benzylpenicillin wurden in einem 100 ml-Meßkolben in Phosphatpuffer (0,1M, pH 6,8) gelöst, mit 50  $\mu$ l Penicillinaselösung (Inhalt einer Neutrapen-Ampulle<sup>4)</sup>) in 2 ml Wasser gelöst, 50  $\mu$ l dieser Lösung entsprechen laut Firmenangabe 25000 Einheiten Penicillinase) versetzt und mit der Pufferlösung auf 100 ml aufgefüllt.

Als Leerwerte wurden in zwei anderen 100 ml-Kolben die gleichen Mengen Benzylpenicillin oder Enzymlösung mit Puffer auf

<sup>4)</sup> Neutrapen = Handelsname für Penicillinase.

100 ml/ aufgefüllt. Die Ansätze wurden 30 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen und dann 0,25 ml/ der so erhaltenen etwa 0,5 mM Lösungen wie vorstehend angegeben zu 10 ml/ 25  $\mu$ M Mercuribenzoatlösung gegeben und der *p*-Mercuribenzoat-Überschuß nach 30 Min. mit 0,5 mM Cysteinlösung zurücktitriert.

#### Alkalische Hydrolyse von Benzylpenicillin

Etwa 50  $\mu$ Mol Benzylpenicillin wurden genau eingewogen, in einem 100 ml-Meßkolben mit 16,5 ml/ 1N NaOH versetzt und bei Raumtemperatur einige Std. stehengelassen. (Bei einer Hydrolysedauer zwischen 1 und 24 Std. ergaben die nachfolgenden Bestimmungen mit *p*-Mercuribenzoat annähernd gleiche Werte.)

Dann wurde mit 33 ml/ 1N Essigsäure abgepuffert (es stellt sich ein pH-Wert von 4,6 ein) und auf 100 ml/ aufgefüllt. 0,25 ml/ der so erhaltenen etwa 0,5 mM Lösungen der Hydrolyseprodukte wurden wie oben angegeben mit *p*-Mercuribenzoat bestimmt.

Wir danken den Farbwerken Hoechst AG für die kostenlose Überlassung von Penicillinen und Penicillinase, den Farnefabriken Bayer AG für Penicillin, der Fa. Heyl & Co. für Penicillin und Penicillamin und der Fa. Schering für die Durchführung der C,H-Bestimmung.

Frau BARBARA WYNHOFF und Fräulein BRIGITTE CLEMENS † danken wir für ihre technische Assistenz.

#### Literatur

1. SIEGMUND, P. und F. KÖRBER, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 317 (1968). — 2. BOYER, P. D., J. Amer. chem. Soc. 76, 4331 (1954). — 3. CHINARD, F. P. und L. HELLERMANN, Method biochem. Analysis 1, 1 (1954). — 4. BENESCH, R. und R. E. BENESCH, Methods biochem. Analysis 10, 43 (1962). — 5. The Chemistry of Penicillin, S. 960, Hrsg. H. T. Clarke, J. R. Johnson und Sir R. Robinson, Princeton University Press, Princeton, New Jersey (1949). — 6. SCHUBERT, M. P., J. biol. Chemistry 121, 539 (1937). — 7. WEITZEL, G., J. ENGELMANN und A.-M. FRETZDORFF, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315, 236 (1959). — 8. RATNER, S. und H. T. CLARKE, Amer. chem. Soc. 59, 200 (1937).

9. BÖHME, H. und H. WOJAHN, Deutsches Arzneibuch, 6. Ausgabe, 3. Nachtrag, Kommentar S. 321—333. Wiss. Verlags-Gesellschaft mbH Stuttgart und Govi-Verlag GmbH Frankfurt/Main (1959). — 10. PERLIN, A. S. und C. BRICE, Canad. J. Chem. 34, 85 (1956). — 11. MERZ, K. W., H. KNIIPS und H. LEHMANN, Pharmazie 20, 764 (1965). — 12. ARMSTRONG, M. D. und V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 168, 373 (1947). — 13. ARMSTRONG, M. D. und V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 173, 749 (1948). — 14. POLLOCK, M. R., Penicillinase, in The Enzymes, 2. Aufl. Bd. 4 S. 269, Hrsg. P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, Academic Press New York und London (1960).

Priv.-Doz. Dr. P. Siegmund  
1 Berlin 33  
Arnimallee 22

## Lokalisation und Charakterisierung der Lipase- bzw. Tributyrinase-Aktivitäten im perirenen Fettgewebe vom Schwein

Von U. H. KLEMENS

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin. (Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Schütte)

(Eingegangen am 6. April 1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

Im perirenen Fettgewebe vom Schwein werden zwei Lipasen und eine Tributyrin spaltende Esterase nachgewiesen. Nach der Enzymcharakteristik handelt es sich um eine Lipoprotein-Lipase, die dem Klärfaktor des Blutes (1, 2) bzw. der pH-8,5-Gewebslipase (3) ähnelt, sowie um eine Lipase, die viele Gemeinsamkeiten mit der Adrenalin-empfindlichen Lipase (3, 4) hat. Die Lipoprotein-Lipase und Tributyrinase sind überwiegend im Überstand des Ultrazentrifugates (120000 g, 2 Std.) lokalisiert. Das dritte beschriebene Enzym erscheint im Sediment.

Wir bestimmten die Substratspezifität, die pH-Optima, die  $K_m$ -Werte, die Stöchiometrie der Lipolyseprodukte, untersuchten die Stabilität der Enzyme unter verschiedenen Bedingungen, die Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch bestimmte Inhibitoren bzw. Aktivatoren, und versuchten, die Enzyme in der Zwischenphase von hydrophoben und hydrophilen Medien anzureichern.

Two lipases and a tributyrin-cleaving esterase were demonstrated in the perirenal fat tissue of the pig. One of the lipases had the properties of a lipoprotein lipase, similar to the clearing factor of blood (1, 2), or the pH 8.5 - tissue lipase (3), and the other lipase had many properties in common with the adrenaline-sensitive lipase (3, 4). The lipoprotein lipase and the tributyrinase are localised predominantly in the supernatant of the ultracentrifugate (120,000 g, 2 hr.). The third enzyme was found in the sediment.

The substrate specificity, pH-optima and  $K_m$ -values of the enzymes, and the stoichiometry of the lipolysis products were determined. The stability of the enzymes under different conditions and the effect of inhibitors and activators on enzyme activity were studied; and it was attempted to concentrate the enzyme in the intermediate phase of hydrophobic and hydrophilic media.

In verschiedenen Geweben, z. B. im epididymalen Fettgewebe (3, 4, 5), im Herzmuskel der Ratte (2, 4, 6), und in der menschlichen Lunge (7) wurden Lipasen nachgewiesen und charakterisiert. Dabei konnten zwei Gewebslipasen differenziert werden:

1. Eine Lipoprotein-Lipase (2) bzw. pH-8,5-Lipase (3), die wahrscheinlich identisch sind. Beide haben viele Gemeinsamkeiten mit dem Klärfaktor des Blutplasmas

(1). Die Lipaseaktivitäten können durch Heparin beeinflusst werden. Man findet einen Anstieg der Lipaseaktivität im Puffermedium einer Fettgewebsinkubation, wenn zum Inkubationsgemisch Heparin hinzugegeben wird (3).

2. Eine Adrenalin-empfindliche Lipase (3, 4) die — im Gegensatz zur Lipoprotein-Lipase — im Fettgewebe von mageren Tieren eine größere Aktivität als bei